

氏名 石 川 徹

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2316 号

学位授与の日付 平成 14 年 3 月 25 日

学位授与の要件 歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 低酸素及び低グルコース環境下における口腔扁平上皮癌細胞株のシスプラチン感受性に関する研究

論文審査委員 教授 菅原 利夫 教授 古田 裕昭 教授 松村 智弘

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

口腔癌を含む多くの固形癌内部では血管形成が不十分なためにおこる低グルコース、低酸素、低pHなど正常組織にはみられない特有の内部環境存在する。近年、この固形癌に特有な内部環境が癌細胞の抗癌剤に対する感受性に影響を与えることが明らかとなった。しかしながら、このような固形癌に特有な内部環境が口腔癌化学療法のKey Drugとされているシスプラチン (CDDP, cis-dichlorodiammineplatinum(II)) の感受性に与える影響については未だ不明な点が多いのが現状である。そこで本研究は低酸素及び低グルコース環境下での口腔扁平上皮癌細胞株のシスプラチン感受性の検討及びその機構について解析を行った。

【材料】

1. 細胞株

口腔扁平上皮癌細胞株

HSC2, HSC3, HSC4, KB, T3M1, KOSC3, SAS, HO-1-u1細胞株を用いた。

2. 培養条件

低酸素環境はMultiGas Incubater (Bio Labo) を用いて、酸素分圧を20～1%に低下させることにより与え、低グルコース環境は培養液中に2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) 10mMを添加することにより与えた。

【実験方法】

1. 低酸素及び低グルコースに環境下におけるHIF-1 α , GRP78蛋白発現の検討

各種口腔扁平上皮癌細胞株を酸素分圧1%で一定時間培養し、蛋白を抽出。SDS-PAGEで分離後、PVDF膜に転写し、抗HIF-1 α 抗体(Santa Cruz $\times 1000$)を反応させ低酸素環境下においてのみ発現が認められるHypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)蛋白を検出した。また、2-DG 10mM を添加した培養液にて、各種口腔扁平上皮癌細胞株を一定時間培養した後蛋白を抽出。抗GRP78抗体(StressGen $\times 1000$)を用いて同様の方法で低グルコース環境下で発現が認められる、Glucose Regulated protein 78 (GRP78)蛋白を検出した。

2. CDDP感受性の検討

低酸素及び低グルコース環境下で各種口腔扁平上皮癌細胞株をCDDP 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で1時間処理した後、72時間同様の条件下で培養した。生細胞数をトリパンブルー色素排除法にて求め、生存率及び低酸素及び低グルコース環境下でのそれぞれのIC50値を算出した。

3. ウェスタンブロット法によるhMLH1,hMSH2,ERCC1蛋白の検出

低酸素及び低グルコース環境下で各種口腔扁平上皮癌細胞株を5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CDDPで1時間処理した後に、CDDPを除き同様の環境下で72時間培養し、蛋白を抽出。SDS-PAGEで分離後、PVDF膜に転写し、hMSH1抗体(Santa Cruz, $\times 1000$), hMSH2抗体(Santa Cruz $\times 1000$), ERCC1抗体(Santa Cruz $\times 1000$)を反応させ蛋白を検出した。

4. DNAポリメラーゼ阻害剤 Aphidicolinとの併用によるシスプラチン感受性の検討

各細胞株を0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CDDPで1時間処理した後、Aphidicolin で24時間処理した。その後、Aphidicolinを48時間培養し、生細胞数をトリパンブルー色素排除法にて求め、生存率を算定した。

5. CDDP, Aphidicolin併用によるアポトーシスの検討

各細胞株を0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CDDPで1時間処理した。その後Aphidicolin で24時間処理を行った後にAphidicolinを除いて48時間培養し、細胞を回収。フローサイトメトリー法を用いて細胞周期分析を行った。また、BrdU標識を行った細胞をCDDP, Aphidicolinで同様に処理し、Cellular DNA Fragmentation Kit (Boehringer Mannheim GmbH Germany)を用いて、細胞質内の放出されたBrdU標識DNA断片を定量した。

【結果及び考察】

1. 各種口腔扁平上皮癌細胞株で酸素分圧1%の低酸素環境下においてHIF-1 α 蛋白の発現が認められた。また、2-DG 10mMを培養液に添加することにより、GRP78蛋白の発現が認められた。このような低酸素及び低グルコース環境下でHIF-1 α , GRP78蛋白を発現させた各種口腔扁平上皮癌細胞株をCDDPで処理するとCDDPに対する高感受性化が観察された。HSC2細胞株において低酸素環境下では19.3倍、低グルコース環境下では17.4倍の感受性の亢進がみられた。

2. ERCC1, hMLH1, hMSH2蛋白発現

低酸素下及び低グルコース環境下においてCDDPで処理すると多くの口腔扁平上皮癌細胞株でERCC1蛋白発現の明らかな減少が認められた。またKOSC3細胞株でhMLH1蛋白発現の増加、HSC4, HO-1-u1細胞株においてhMSH2蛋白発現の増加が認められた。これらのことから、口腔扁平上皮癌細胞株における低酸素及び低グルコース環境下でのCDDP高感受性化にはヌクレオチド除去修復、DNAミスマッチ修復が関与することが示唆された。

3. DNA損傷修復において正常DNA鎖合成するDNAポリメラーゼの働きを抑制するAphidicolinをCDDPと併用することにより各種口腔扁平上皮癌細胞株のCDDPに対する高感受性化が観察された。細胞周期分析ではCDDP処理後48時間からSub-G1期がみられ、同時にDNA断片の増加が観察された。HSC4細胞株ではCDDP処理後72時間でCDDP単独処理に比べDNA断片は7.17倍に増加した。これらのことから、Aphidicolinを併用することによってCDDPによるDNA損傷に対する修復が抑制された為に癌細胞にアポトーシスが誘導されたと考えられ、固形癌に対する新たな化学療法としてCDDPとDNA polymerase阻害剤との併用の可能性が示唆された。

【結論】

低酸素及びグルコース飢餓環境下でストレス応答した口腔扁平上皮癌細胞株はCDDPに対して高感受性化し、その機構としてDNA損傷に対する修復機構の関与が示唆された。

論文審査結果の要旨

口腔癌を含む多くの固形癌内部では血管形成が不十分なためにおこる低グルコース、低酸素、低pHなど正常組織にはみられない特有の内部環境存在する。近年、この固形癌に特有な内部環境が癌細胞の抗癌剤に対する感受性に影響を与えることが明らかとなった。しかしながら、このような固形癌に特有な内部環境が口腔扁平上皮癌化学療法のKey Drugとされているシスプラチン（CDDP, cis-dichlorodiammine-platinum(II)）の感受性に与える影響については未だ不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では口腔扁平上皮癌細胞株における低酸素及び低グルコース環境下でのCDDPに対する感受性の検討及びその機構について検討し、同時にその機構を用いた新たな癌化学療法の可能性について検討を行った。

低酸素及び低グルコース環境下において各種口腔扁平上皮癌細胞株をCDDPで処理するとCDDPに対する高感受性化が観察された。その機構として低酸素下及び低グルコース環境下においてCDDPで処理すると多くの口腔扁平上皮癌細胞株でERCC1蛋白発現の明らかな減少が認められた。またその他の細胞株ではhMLH1蛋白発現の増加、hMSH2蛋白発現の増加も認められたことから口腔扁平上皮癌細胞株における低酸素及びグルコース飢餓環境下でのCDDP高感受性化にはヌクレオチド除去修復、DNAミスマッチ修復が関与することが示唆された。

このヌクレオチド除去修復機構、DNAミスマッチ修復機構の共通部分であるDNAポリメラーゼの働きを阻害するAphidicolinをCDDPと併用することにより口腔扁平上皮癌細胞株のCDDPに対する高感受性化が観察され、DNA断片化も増加したことから、Aphidicolinを併用することによりCDDPによるDNA損傷に対する修復機構が働かず、癌細胞にアポトーシスが誘導されたと考えられた。これらのことから、固形癌に対する新たな化学療法としてCDDPとDNA polymerase阻害剤との併用の可能性が示唆され、口腔扁平上皮癌に対する癌化学療法の研究を行うにあたり、本研究内容は価値あるものである。

したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。